

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

ANA RITA RODRIGUES DE ALMEIDA SILVA

**Investigação fitoquímica e quantificação de ácido rosmarínico por
CLAE-DAD em *Cordia rufescens* A.DC**

João Pessoa - PB
2017

ANA RITA RODRIGUES DE ALMEIDA SILVA

**Investigação fitoquímica e quantificação de ácido rosmarínico por
CLAE-DAD em *Cordia rufescens* A.DC**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Farmácia, do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

COORIENTADOR: Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

S586i Silva, Ana Rita Rodrigues de Almeida.

Investigação fitoquímica e quantificação de ácido rosmarínico por CLAE-DAD em *Cordia rufescens* A.DC / Ana Rita Rodrigues de Almeida Silva. -- João Pessoa: [s.n.], 2017.

51f.; il.--

Orientador: Josean Fachine Tavares.

Co-orientador: Vicente Carlos de Oliveira Costa.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Boraginaceae. 2. *Cordia rufescens*. 3. Ácido rosmarínico.

BS/CCS/UFPB

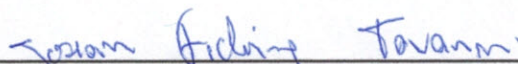
CDU: 547.9(043.2)

ANA RITA RODRIGUES DE ALMEIDA SILVA

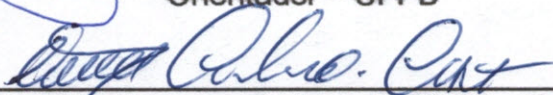
**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO
ROSMARÍNICO POR CLAE-DAD EM *Cordia rufescens* A.DC**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do Curso de
Farmácia da Universidade Federal da
Paraíba como pré-requisito para obtenção
do título de Farmacêutico.

Aprovado em 29 de novembro de 2017.



Prof. Dr. Josean Fachine Tavares
Orientador – UFPB



Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa
Coorientador – UFPB



Profa. Dra. Elisana Afonso de Moura Pires
Examinadora – FACENE/FAMENE

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Examinador – UFPB

“Eu me lembro dos dias em que eu orei por coisas que tenho hoje”
D.A.

A Deus, pelo dom da vida, por sua presença em todos os momentos e por ter colocado esse sonho em meu coração. A minha mãe, meu maior exemplo, por todo amor, dedicação, incentivo e apoio. Sem o cuidado de vocês eu não teria chegado até aqui.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por estar comigo em todos os momentos, pela oportunidade de sonhar e realizar esse sonho, sem Ele eu nada seria, nem teria conseguido chegar até aqui.

A minha mãe **Antonia Rodrigues** meu alicerce, por colocar as filhas em primeiro lugar e não medir esforços para o nosso crescimento, por todo amor, carinho, proteção e nunca ter deixado faltar nada. Por ser ombro amigo todas as vezes que eu achei que não conseguiria, por dobrar os joelhos incansavelmente para conversar com Deus e pedir para que Ele me protegesse e ajudasse, por ter compreendido toda a minha ausência e renúncia, e sempre ter acreditado em mim. És meu maior incentivo e exemplo.

Ao meu pai **Nivaldo Correia** (in memorian), um dos meus maiores orgulhos é quando dizem que tenho seu carisma, e o quanto estarias orgulhoso desse momento. Se eu pudesse fazer um pedido, seria ter você nesse momento, compartilhando essa alegria. Minha maior saudade.

As minhas irmãs **Cristiane** e **Williane**, por dividirem a vida comigo e torcerem tanto pelo meu crescimento. Vocês são exemplos para mim, pela garra e determinação para conquistar a vida. Ao meu sobrinho Danielzinho, por ter despertado em mim um amor inimaginável, e ter trazido leveza e sorrisos nas nossas vidas.

A minha família, avó, tios e tias, primos e primas por todo apoio, motivação. Por acreditarem na concretização de mais uma etapa e pela compreensão nos momentos ausentes

A minha segunda casa, meu cafofo, **Júnior**, **Glycia** e **Rayane**, vocês tornaram os dias distantes de casa mais leve, eu sempre desesperada e vocês: “vai dá tudo certo”. Aguentaram choros, chatices, leseiras, muita risada e me acordaram em todos os virotes em que meu cochilo quase me fazia perder a prova. **Jacielly** e **Júnior Vandalberto** que também já passaram por aqui e dividimos as mesmas experiências. Além de primos e amiga vocês se tornaram irmãos.

A professora **Bagnólia Costa**, a “chave” para minha Iniciação Científica. Gratidão por ter me indicado ao laboratório, ter visto em mim um potencial que eu não imaginava. O seu amor pelo curso/profissão é uma injeção de ânimo todos os dias.

Ao meu orientador **Vicente Carlos** por não ser aquele “velhinho do lattes”. Por todo incentivo, ensinamentos e ajuda durante três anos de Iniciação Científica. Por ser orientador, pai e amigo, eu não teria conseguido ir tão longe na graduação sem a sua ajuda. És o maior exemplo de um excelente pesquisador e profissional, é um privilégio para mim ser sua aluna. Obrigada por sempre acreditar que sou capaz. Que venham os próximos anos (mestrado e doutorado).

Aos professores **Josean Fechine Tavares, Marcelo Sobral da Silva e José Maria Barbosa Filho**, por toda disponibilidade, ensinamentos e contribuição no âmbito da pesquisa. Vocês são grandes exemplos para mim.

A professora e amiga **Elisana**, por toda paciência, compreensão, confidências e amizade. Os meses que me ajudou no laboratório, as disciplinas que você lecionou, o prazer e satisfação de ter sido sua aluna, me trouxeram ensinamentos para vida inteira. És incrível.

A doutoranda, amiga e irmã **Andreza Barbosa**, meu primeiro contato no laboratório, que juntamente com Vicente me ensinou os primeiros passos. Obrigada por todo conhecimento repassado, todas as correções para que os erros de iniciante não fossem repetidos, por ser uma amiga maravilhosa, e por ter me dado mais um sobrinho (Bê).

Ao doutorando e amigo **Yuri Manguiera**, por toda disponibilidade para a realização dos experimentos. Pela grande ajuda e conhecimentos compartilhados e por me aguentar estressada e desanimada quando os resultados não eram bons. Foram longas noites de experimento, mas com boa vontade, companheirismo e muitos “Vai dá certo”. Obrigada, é muito bom saber que temos amigos com quem contar!

A toda equipe **SFCB** (Sobral, Fechine, Costa e Barbosa) todos os pós-graduandos, técnicos, alunos de Iniciação Científica e professores que constroem essa equipe. Vocês foram essenciais para todo trabalho realizado no laboratório, a ajuda, força e incentivo de vocês é o que nos faz seguir em frente.

Aos meus amigos, fui presenteada com muitos de qualidade. O que seria da vida sem vocês? “New graxas”, “A vida é um BBB sem um milhão”, “Istilo”, “Carambas”, “O tanque”, “Táxi da fofoca”, “Turma da mídia”, vocês foram ânimo e confiança nos dias difíceis. Obrigada por serem os melhores que eu poderia ter!

A turma incrivelmente maravilhosa “Prof Zélia Braz Vieira da Silva Pontes” a famosa “Farmundiça”. Me disseram uma vez que a universidade era a melhor fase da vida, e vocês fizeram disso uma realidade, pessoas incríveis com o mesmo objetivo, tornando os anos da graduação divertidos, cheio de amor e agora profissionais de qualidade, os melhores e mais descontraídos farmacêuticos do mercado estão chegando. Muito feliz por ter vivido tudo isso com vocês. Amigos que levarei por toda minha vida, que se fosse mencionar a importância de cada um os agradecimentos seriam maior que todo o trabalho. Mas, não poderia jamais deixar de mencionar aqueles que marcaram demais minha graduação, os que tornaram irmãos.

A **Sarah Ramos**, companheira das primeiras dificuldades, enfrentamos tanta coisa juntas, superamos, crescemos, choramos, sorrimos e vencemos. Fofinha, obrigada por ser ombro amigo sempre, chegamos ao tão sonhado fim, na verdade agora é o início de uma nova fase, e reforço as promessas do p1 “estarei ao teu lado em todos os momentos”. Tua força e encorajamento foram essenciais nessa caminhada.

A **Rodrigo Andrade (Jarrinho)**, o maior aperreio desse mundo, mas não sei como seria essa graduação sem teu bom humor. Obrigada por está comigo em todos os momentos, por sempre me encorajar e todas as vezes em que eu digo que não vou conseguir eu escuto: “Vai sim, deixe de safadeza e vá estudar”. Te admiro muito por tua inteligência e dedicação, garotinho número 1 em audiência. Conta

comigo sempre, e inFELIZMENTE terei mais dois anos dos teus abusos no mestrado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Cordia rufescens A. DC. é uma espécie pertencente a família Boraginaceae, encontrada no Nordeste brasileiro, conhecida popularmente como “ramela de velho”, “grão de galo” ou “pau pombo”. Poucos estudos são encontrados na literatura em relação a esta espécie. Diante disto, decidiu-se estudar seus constituintes com uma abordagem mais precisa utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a receptor de arranjo de diodo (CLAE-DAD). As folhas de *Cordia rufescens* foram coletadas no município de Cruz do Espírito Santo – PB, sendo o material identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, na Universidade Federal da Paraíba sob identificação AGRA 5994. Em seguida, foi seco em estufa de ar circulante à temperatura média de 40 °C, pulverizado em moinho mecânico e submetido a maceração com EtOH a 95%. O extrato etanólico bruto (EEB) (106,10 g) foi dissolvido em uma solução de metanol:água (7:3 v/v) e submetido a um processo de partição com os seguintes solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila. A fase acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e como fase móvel, os solventes acetato de etila e metanol, puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Obtendo-se 32 frações que após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram reunidas de acordo com os seus respectivos fatores de retenção (R_fs). A fração 12 apresentou-se como uma mancha única, e foi submetida à análise de RMN de ¹H e ¹³C sendo observado que se tratava de uma mistura, portanto esta foi submetida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala preparativa e resultou nas substâncias identificadas ácido rosmarínico. Desta forma, além de constatar a presença de ácido rosmarínico, substância de grande potencial terapêutico, foi realizada a quantificação deste. Para análise cromatográfica do EEB e do padrão foi desenvolvida uma metodologia na qual a fase móvel utilizada foi metanol (MeOH) com água (H₂O) ultrapura a 0,1% de ácido fosfórico numa proporção inicial de (38:48 v/v) MeOH / H₂O. A corrida teve um tempo total de 60 minutos. A eluição foi realizada em modo gradiente, de 38 a 42% em 5 min, 42 a 45% em 9 min, 45 a 50% em 12 min, 50 a 45% em 15 min, 45 a 40% em 17 min, 40 a 38% em 20 min, 38 a 38% em 23 min, permanecendo isocrático até 60 min. O volume de injeção foi de 20 µL, com fluxo de fase móvel constante de 1,0 mL / min e a detecção foi feita utilizando um detector de arranjo fotodiodo (DAD) em comprimento de onda de 330 nm. Após a análise dos dados obtidos foi possível então observar que para cada 5 mg de EEB a quantidade de ácido rosmarínico é 71,9252 ± 1,8637 µg. Os resultados desse trabalho mostraram o isolamento e a quantificação do ácido rosmarínico na espécie *Cordia rufescens* contribuindo para o estudo quimiotaxonômico e futura padronização do extrato do vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: Boraginaceae; *Cordia rufescens*; Ácido rosmarínico

ABSTRACT

Cordia rufescens A. DC. is a species belonging to a Boraginaceae family, found in the Brazilian Northeast, popularly known as "ramela de velho", "grão de galho" or "pau pombo". Few studies are found in the literature regarding this species. In view of this, it was decided to study its constituents with a more accurate approach using High Efficiency Liquid Chromatography connected a diode arrangement receiver (HPLC-DAD). As *Cordia rufescens* leaves were collected in the municipality of Cruz do Espírito Santo - PB, the material identified by Profa. Dr. Maria de Fátima Agra and a deposited exsicata not Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier, at the Federal University of Paraíba under identification AGRA 5994. It was then dried in a circulation oven at an average temperature of 40 ° C, pulverized in a mechanical mill and subjected to a maceration with 95% EtOH. The crude ethanolic extract (BSA) (106.10 g) was dissolved in a methanol: water (7:3 v/v) solution and partitioned with the following solvents: hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The ethyl acetate phase was subjected to column chromatography, using gel 60 as the stationary phase and as the mobile phase, ethyl acetate and methanol solvents, pure and in batch mixtures in increasing order of polarity. Obtaining 32 fractions which are then analyzed by analytical thin layer chromatography (TLC) were pooled according to their own retention factors (R_fs). Fraction 12 presented as a single spot, and was subjected to ¹H and ¹³C NMR analysis and it was observed that it was a mixture, so it was subjected to the analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a preparative scale and resulted in the substances identified rosmarinic acid. Thus, in addition to finding a presence of rosmarinic acid, a substance with great therapeutic potential, a quantification of this was performed. (38:48 v/v) MeOH/H₂O. Chromatographic analysis of BSE and the standard was developed a methodology in which the mobile phase used for methanol (MeOH) with water a run ran a total time of 60 minutes. Production was performed in gradient mode, 38 to 42% in 5 min, 42 to 45% in 9 min, 45 to 50% in 12 min, 50 to 45% in 15 min, 45 to 40% in 17 min, 40 38% in 20 min, 38 to 38% in 23 min, remaining isocratic for up to 60 min. The injection volume was 20 µL, mobile phase flow of 1.0 mL/min and a detection was done using a photodiode array detector (DAD) at wavelength of 330 nm. After an analysis of the data obtained, it was observed for every 5 mg of BSE an amount of rosmarinic acid is 71.9252 ± 1,8637 µg The results of this work are revealed and isolated and a quantification of rosmarinic acid in the species *Cordia rufescens* contributing to the chemotaxonomic study and standardization of the vegetable extract.

KEY WORDS: Boraginaceae; *Cordia rufescens*; Rosmarinic acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição da família Boraginaceae no mundo, representada em verde.....	22
Figura 2: Flavonoides e fenilpropanoides de <i>Cordia</i> spp.....	23
Figura 3: Espécie <i>Cordia rufescens</i> A.DC.....	24
Figura 4: Mapa de distribuição de <i>Cordia rufescens</i> A. DC. no Brasil.....	25
Figura 5: Estrutura química do ácido rosmarínico.....	26
Figura 6 – Modo de eluição.....	33
Figura 7: Espectro de RMN de ^1H da fração 12 da fase acetato de etila de <i>Cordia rufescens</i> (δ , CD_3OD , 400 MHz).....	35
Figura 8: Cromatograma da fração 12 da fase acetato de etila de <i>Cordia rufescens</i> A.DC. por CLAE em escala analítica.....	35
Figura 9: Cromatograma da fração 12 da fase acetato de etila de <i>Cordia rufescens</i> A.DC. por CLAE em escala preparativa.....	36
Figura 10: Estrutura ácido rosmarínico.....	37
Figura 11: Espectro de RMN de ^1H Cr-AR (δ , CD_3OD , 400 MHz).....	38
Figura 12: Expansão do espectro de RMN de ^1H Cr-AR (δ , CD_3OD , 400 MHz)...	38
Figura 13: Expansão do espectro de RMN de ^1H Cr-AR (δ , CD_3OD , 400 MHz)...	38
Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C – APT Cr-AR (δ , CD_3OD , 100 MHz).....	39
Figura 15: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT Cr-AR (δ , CD_3OD , 100 MHz).....	39

Figura 16: Perfil cromatográfico do EEB.....	41
Figura 17: Curva de pureza do EEB.....	42
Figura 18: Perfil cromatográfico do padrão de ácido rosmarínico.....	42
Figura 19: Curva de pureza do padrão ácido rosmarínico.....	44
Figura 20: Cromatograma da co-injeção do EEB com o padrão ácido rosmarínico.....	45
Figura 21: Curva de pureza da co-injeção do EEB com o padrão ácido rosmarínico.....	45
Figura 22: Sobreposição espectro de ultravioleta do EEB com o padrão ácido rosmarínico.....	46
Figura 23: Curva de titulação utilizada para quantificação do ácido rosmarínico.....	45

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Etapas envolvidas no processo de obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de *Cordia rufescens* A.D. C.....30

Esquema 2: Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *Cordia rufescens* A.D C.31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Deslocamentos químicos de ^1H E ^{13}C do ácido rosmarínico.....	36
Tabela 2: Concentrações utilizadas e média das áreas obtidas nos cromatogramas.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 Produtos Naturais.....	20
2.2 Considerações sobre a família Boraginaceae.....	21
2.3 Considerações sobre o gênero <i>Cordia</i>	22
2.4 Considerações sobre a espécie <i>Cordia rufescens</i>	24
2.5 Considerações sobre o Ácido Rosmarínico.....	25
2.6 Considerações sobre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	28
4 METODOLOGIA.....	28
4.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	28
4.2. Processamento do material vegetal de <i>Cordia rufescens</i> A.DC.	28
4.3. Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas e caules de <i>Cordia rufescens</i> A.DC.....	28
4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) do material vegetal de <i>Cordia rufescens</i> A.DC.....	29

4.5. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de <i>Cordia rufescens</i> A.DC.	30
4.6. Caracterização estrutural do composto isolado.....	31
4.7. Ressonância Magnética Nuclear.....	31
4.8. Caracterização do perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto de <i>Cordia rufescens</i>	31
4.8.1. Materiais.....	32
4.8.2. Equipamentos.....	33
4.8.3. Desenvolvimento.....	33
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	34
5.1. Estudo fitoquímico das folhas de <i>Cordia rufescens</i> A. DC.....	34
5.1.1 Determinação estrutural de Cr-AR.....	34
5.2. Quantificação do Ácido Rosmarínico no Extrato Etanólico Bruto (EEB) de <i>Cordia rufescens</i> A. DC.....	41
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

As plantas são tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes, no controle de diversas doenças e pragas. Tornando-se uma alternativa terapêutica de grande aceitação pela população, tanto nas pequenas comunidades rurais como nos centros urbanos. Este fato vem chamando a atenção da comunidade científica para comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (FREITAS et al., 2010).

O uso de plantas medicinais nos países em desenvolvimento e de sociedades rurais é ainda um recurso precioso e indispensável, além disso, elas fornecem uma alternativa viável aos sistemas de saúde de atenção primária por possuírem propriedades terapêuticas, já que vêm sendo utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias doenças (CALIXTO, 2003).

Diversas plantas tropicais têm utilização na medicina popular e encontram-se documentadas por dados etnobotânicos. Desta forma, o isolamento e a identificação estrutural de substâncias orgânicas representam importância fundamental para o desenvolvimento científico da química de produtos naturais e colaboram com o progresso de distintas atividades científicas e tecnológicas no país (BRAZ FILHO, 2010).

Inúmeras plantas pertencentes à família Boraginaceae são utilizadas na medicina popular, outras são produtoras de madeira de boa qualidade, inclusive resistente ao ataque de fungos, insetos e microrganismos (SANTOS et al., 2006). Em virtude disso, plantas desta família tem sido alvo de estudos como fonte de substâncias bioativas de interesse da indústria farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, poucas espécies desta família foram estudadas detalhadamente sob o ponto de vista químico ou farmacológico (FREITAS, 2010; BARROSO et al., 2002).

O ácido rosmarínico é uma das substâncias presentes na família Boraginaceae que tem atraído a atenção devido ao amplo espectro de atividades biológicas que apresenta. Essa substância é também encontrada em outras espécies de uso culinário e terapêutico, tais como alecrim, tomilho, orégano, manjerição, “boldo falso”, erva-cidreira. Vários estudos comprovaram o potencial

terapêutico do ácido rosmarínico, que explicam o uso tradicional de várias plantas que o contém (ALKAM et al., 2007).

No estado da Paraíba o uso de plantas medicinais com fins terapêuticos é bastante comum, principalmente no meio rural e urbano de baixo poder aquisitivo. Estima-se que cerca de 300 espécies sejam empregadas na medicina popular local (BARBOSA-FILHO, 1997) e pelo menos sete dezenas já foram ou estão sendo estudadas pela nossa equipe no Programa em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB/ CCS/ UFPB) que vem desenvolvendo pesquisas com plantas medicinais há quarenta anos, formando recursos humanos na área de produtos naturais e descobrindo novas moléculas com potencial farmacológico.

O progresso tecnológico dos métodos cromatográficos é de grande importância para acelerar o isolamento e identificação de novas substâncias bioativas, como, por exemplo, extratos vegetais, que devem passar por uma triagem química e biológica. Nesta perspectiva, os perfis cromatográficos possibilitam uma visão mais ampla sobre a composição química de organismos vivos, uma vez que, por meio deles é observado um grande número de metabólitos e compostos bioativos. Esses estudos utilizam técnicas combinadas, que tem como fundamento a separação cromatográfica de substâncias utilizando cromatografia em fase gasosa (CG) ou líquida (CL), acoplada a técnicas espectrométricas para detecção, como espectrofotômetro de UV-Vis (DAD) e espectrometria de massas (EM) (FARAGA et al., 2012).

Dessa forma, e percebendo o potencial das plantas da família Boraginaceae, que são conhecidas por apresentarem metabólitos secundários como saponinas, lignoides, flavonoides (SANTOS et al., 2003; SILVA et al., 2004a), dentre os quais muitos deles possuem potencial farmacológico, e levando também em consideração a escassez de estudos fitoquímicos e farmacológicos relacionados a espécie *Cordia rufescens* A.DC., o presente trabalho apresenta um estudo de investigação fitoquímica e do teor do Ácido Rosmarínico na espécie. Considerado marcador químico em espécies dessa família e tem destacada atividade antioxidante.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Produtos naturais

Os produtos naturais caracterizam-se como compostos químicos obtidos de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos que atuam como protótipos básicos para a síntese de diferentes fármacos (KUMAR et al., 2014).

No contexto dos produtos naturais, as plantas medicinais destacam-se também por serem fontes naturais de uma infinidade de substâncias químicas com funções vitais. Essas substâncias podem ser importantes para os seres humanos, uma vez que ao apresentarem atividades farmacológicas, podem ser aplicadas na área terapêutica, atuando como medicamento. A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, remissão parcial e/ou total, bem como, para prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005).

Estima-se que entre 25% a 50% dos medicamentos comercializados atualmente foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, em especial as plantas medicinais (KINGSTON, 2011). Cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento, como o Brasil, faz uso de espécies vegetais nas necessidades primárias de saúde (BRAZ-FILHO, 2010).

No Brasil, muitas classes de princípios ativos vêm sendo isoladas de plantas medicinais, uma vez que o país tem a maior biodiversidade mundial, considerando que ele abriga em torno de 20% de todas as espécies vegetais do planeta. Este contexto reflete a utilização de produtos medicinais a base de plantas na medicina popular em diversas enfermidades por grande parte da população brasileira. Esta terapêutica tão presente entre os brasileiros, tornou-se de interesse da comunidade científica que, ao longo de 28 anos, publicou aproximadamente 3.4614 estudos sobre plantas que envolvem principalmente a detecção, isolamento e avaliação toxicológica de seus componentes ativos (DUTRA et al., 2016; NEWMAN et al., 2013; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

As diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais e na implantação da fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS).

Dentro dessa perspectiva, em 2006, por meio do Decreto nº 5.813, foi implantada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que consolidou a fitoterapia como uma política de estado (BRASIL, 2006). Em 2008, foi lançado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), com objetivo de garantir o acesso às plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2008).

O Ministério da Saúde divulgou, em 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), uma lista de 71 espécies que possam gerar possíveis medicamentos para serem distribuídos pelo SUS. Também foi elaborada a RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos).

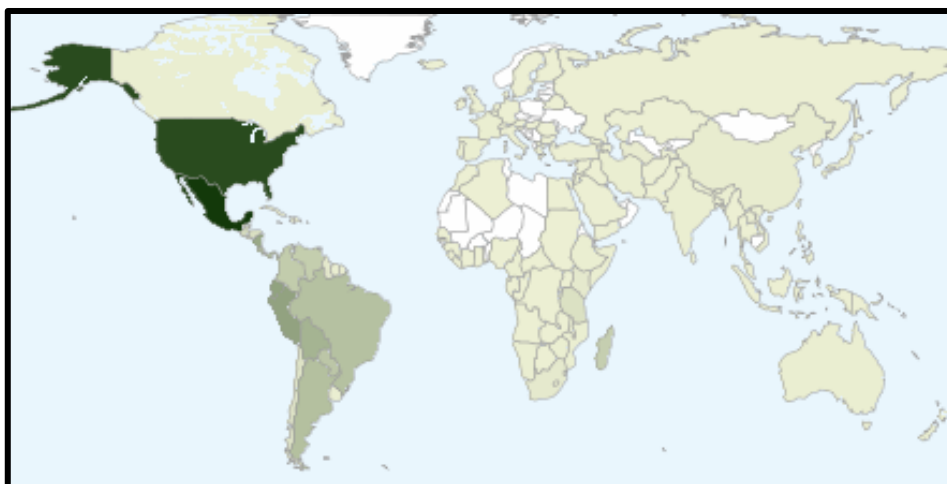
2.2. Boraginaceae

A família Boraginaceae, foi identificada por Jussieu em 1789, a que pertence o gênero *Cordia* L., conta com cerca de 130 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Seus maiores centros de dispersão localizadas nas regiões mediterrâneas e nos Estados Unidos da América (Figura 1, página 22) (MELO e LIRA LEMOS, 2008).

No Brasil, esta família está representada pelos gêneros *Auxemma*, *Borago*, *Cynoglossum*, *Cordia*, *Echium*, *Lepidocordia*, *Moritzia*, *Patagonula*, *Rotula*, *Symphytum*, *Tounerfortia* e *Thaumatocaryum* (BARROSO, 1986). Dentre estes, o gênero *Cordia* possui grande importância.

Esta família caracteriza-se quimicamente pelos metabólitos secundários das classes dos compostos benzilados, como por exemplo, ácidos fenólicos, lignoides e flavonoides. Entre as espécies que possuem estas classes de substâncias cita-se: *Borago officinalis* com ácido caféico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico e ácido rosmarínico (GUDEJ; TOMCZYK, 1996); *Symphytum asperum* com o polióxi-1-carboxi-2- (3,4-diidroxifenil)-etileno (BARBAKADZE et al., 2000).

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Boraginaceae no mundo, representada em verde.



Fonte: <http://tropicos.org/Name/42000289?tab=maps>. Acessado em 01/08/2017

2.3. *Cordia*

O gênero *Cordia* é um dos mais representativos da família Boraginaceae composto por aproximadamente 320 espécies distribuídas mundialmente entre árvores, arbustos e ervas (SPOON & KESSELI, 2008). Embora pantropical, este táxon tem seu maior centro de diversidade no Novo Mundo, sendo particularmente bem representado no Brasil, onde podem ser encontradas cerca de 65 espécies. Esse gênero é um dos maiores e mais importantes da família Boraginaceae devido aos seus aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e importância econômica (BARROSO et al., 2002).

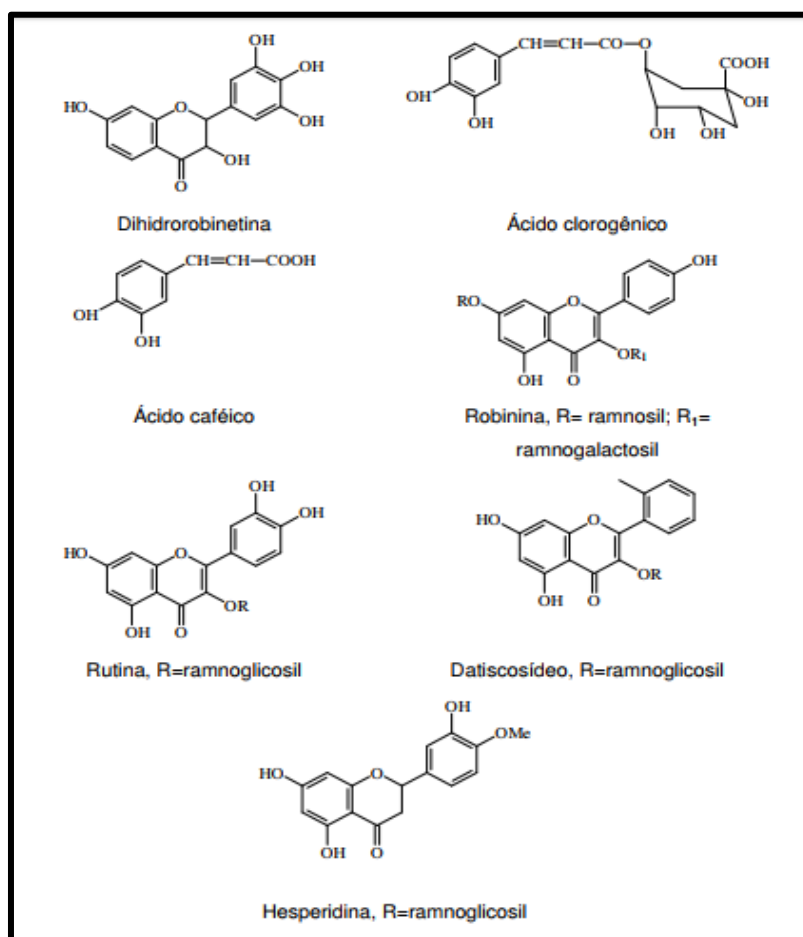
Espécies do gênero *Cordia* são utilizadas na medicina popular, para o combate de inúmeros males. A espécie *Cordia leucocephala* (“maria-preta”) tem suas folhas utilizadas na forma de infuso para tratamento de dismenorreia (AGRA, 1996). *Cordia salicifolia* (“chá-de-bugre” ou “café-do-mato”) é comercializada no Brasil em forma de sachês, tinturas ou extrato fluido, com atividades diurética, emagrecedora, cicatrizante e emoliente (SAITO; OLIVEIRA, 1986).

No gênero *Cordia* ocorre produção de diversos metabólitos secundários estruturalmente variados. Uma grande série de compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides pirrolizidínicos, taninos e derivados fenilpropanóides têm sido observados no gênero. Além destes, triterpenos, sesquiterpenos, cromenos, hidroquinonas,

saponinas e um número significativo de naftoquinonas e benzoquinonas terpênicas (DE MENEZES et al, 2005)

Algumas espécies desse gênero foram investigadas em relação às atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antiartríticas em ratos, mostrando resultados significativos (FICARRA, et al, 1995). Dos resultados obtidos destacam-se os extratos das folhas de *C. francisci*, *C. myxa* e *C. serratifolia*. A análise química revelou a presença de flavonóides nas folhas, como dihidrorobinetina, robinina, rutina, datiscosídeo e hesperidina em *C. francisci*, *C. martinicensis*, *C. myxa*, *C. serratifolia* e *C. ulmifolia* (Figura 2, página 23) (CHAUHAN & SRIVASTAVA, 1978).

Figura 2 – Flavonoides e fenilpropanoides de *Cordia* spp.



Fonte: Vale (2017)

2.4 *Cordia rufescens*

Cordia rufescens (sinonímia: *C. piauiensis*) (Figura 3, página 24) é um arbusto ereto; Folhas simples, inteiras, alternas. Ocorre apenas no Brasil, nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (Figura 4, página 25). É conhecida popularmente no Nordeste do Brasil como “ramela de velho”, “grão de galo” ou “pau pombo”. (MELO & ANDRADE, 2007), enquanto que em Minas Gerais essa espécie é conhecida como “mulato-branco” ou “bago-de-boi”. É utilizada na marcenaria pela durabilidade de sua madeira (BARROSO, et al, 2002).

Esta espécie é distinta das espécies de *Cordia* encontradas no Nordeste pelos ramos geralmente 21 tufos com folhas alternas, espiraladas, aliadas à inflorescência paniculada portando flores com cálice tomentoso, rufo, e pelos frutos ovóides (MELO & ANDRADE, 2007).

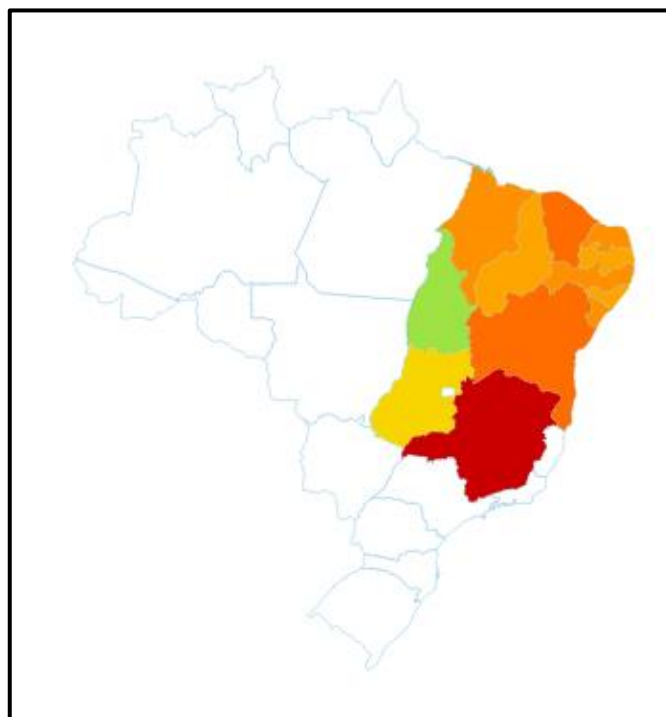
Figura 3 - Espécie *Cordia rufescens* A.DC.



Fonte: <https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Boraginaceae.htm>.

Acessado em 01/08/2017

Figura 4 – Mapa de distribuição de *Cordia rufescens* A. DC. no Brasil destacado em cores



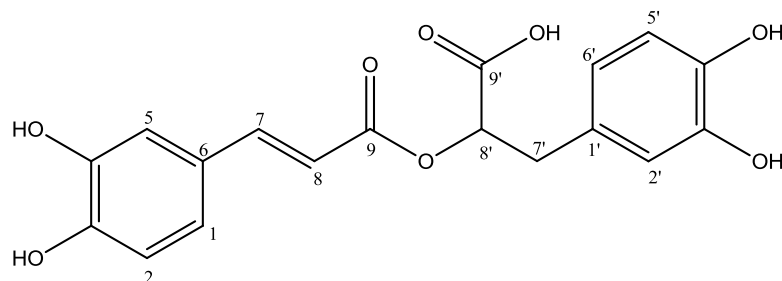
Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16526>

Até o presente momento, poucos estudos foram realizados, tanto na parte de farmacologia, como na fitoquímica. O primeiro estudo fitoquímico da espécie relata o isolamento e determinação estrutural de uma nova saponina e seu derivado obtidos do extrato metanólico dos caules (SANTOS et al., 2003a). Subsequentemente foi relatado o isolamento de duas outras saponinas triterpênicas do mesmo extrato. Além dos terpenos também foi isolado de *C. rufescens* uma nova lignana do tipo arilnaftaleno, a partir do extrato etanólico dos caules e ramos (SILVA, et al., 2004b)

2.5. Ácido Rosmarínico

Ácido Rosmarínico ((2''R ") - 2 - [[(2''E ") - 3- (3,4-Di-hidroxifenil) -1-oxo-2-propenil]] oxi] -3- (3,4 di-hidroxifenil) propanóico) (figura 5, página 26) é um derivado hidroxicinâmico, caracterizado por ser um composto fenólico não flavonoide. Consiste em um éster do ácido cafeico e do ácido 3,4- dihidroxifenilato (TEKELOVÁ et al., 2015).

Figura 5- Estrutura química do ácido rosmarínico.



Foi isolado pela primeira vez de *Rosmarinus officinalis* e é encontrado em mais de 39 famílias de plantas, principalmente a família Lamiaceae e Boraginaceae (PETERSEN et al., 2009).

Atividades farmacológicas envolvendo o ácido rosmarínico avaliaram o efeito antimicrobiano (MORENO et al., 2006), antioxidante (TEPEA et al., 2007), antiapoptótico (HUR et al., 2007), anticâncer (MOON et al., 2010), no tratamento do Alzheimer (HAMAGUICHI et al., 2009), hepatoprotetor (DOMITROVIC et al., 2013), neuroprotetor (ONO et al., 2012), anti-inflamatório (CHU et al., 2012) e gastroprotetor (NASCIMENTO et al., 2016).

Desta forma é notada a importância deste composto na busca de novos produtos farmacêuticos, para o tratamento de diversas doenças visto que o ácido rosmarínico possui grande potencial terapêutico diante da diversidade de atividades farmacológicas já apresentadas na literatura. Sendo assim, a continuidade nos estudos buscando o isolamento desse polifenol de plantas medicinais do gênero *Cordia* por exemplo, com a perspectiva de continuidade dos estudos fitoquímicos.

2.6. Considerações sobre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A grande diversidade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é

atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, removendo as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (LANÇAS, 2009).

A técnica de CLAE revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permite a injeção de volumes de amostra cada vez menores e reprodutíveis além detecção de quantidades de analito cada vez menores em sistemas de detecção em fluxo, que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna (COLLINS, 2006).

O que caracteriza a separação em CLAE é a distribuição de moléculas na fase móvel e estacionária que são imiscíveis de acordo com seu coeficiente de partição. A fase móvel transporta o analito pela fase estacionária e durante essa passagem, os analitos da mistura interagem com a fase móvel e com a fase estacionária, o que retém seletivamente cada analito. Ao sair da fase estacionária o analito passa por um sistema de detecção com alta sensibilidade que registra sua passagem em função do tempo, representado pelo cromatograma. (COLLINS; BRAGA; BONATO, et al., 2006).

Os fitoterápicos representam uma classe de medicamentos bastante utilizada no Brasil e constituem um mercado em crescimento. Para a produção de um medicamento fitoterápico é necessário conhecimento da droga vegetal com relação aos seus constituintes químicos e atividades biológicas. Além disso, o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, envolvendo análises físico-químicas e microbiológicas, é etapa fundamental para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA et al., 2006). Parte deste processo exige o desenvolvimento de métodos analíticos validados para análise da matéria-prima vegetal, com a finalidade de serem definidos seu perfil químico e a substância utilizada para padronização do material. Várias técnicas analíticas podem ser empregadas dentre as quais a mais usada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual exige um padrão de referência comercial ou obtido através de técnicas de isolamento e purificação.

3 OBJETIVO

3.1. Geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero *Cordia* através do estudo fitoquímico de *Cordia rufescens* A.DC.

3.2 Específicos

- Isolar, purificar, caracterizar e identificar/determinar constituintes químicos fixos das partes aéreas de *Cordia rufescens* A.DC., utilizando técnicas cromatográficas convencionais e por CLAE-DAD;
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE-DAD para quantificar o ácido rosmarínico nas folhas de *Cordia rufescens* A. DC.

4 METODOLOGIA

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal (folhas) de *Cordia rufescens* foi coletada em agosto de 2002 no município de Cruz do Espírito Santo - PB. Em seguida identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, na Universidade Federal da Paraíba sob identificação AGRA 5994.

4.2. Processamento do material vegetal de *Cordia rufescens* A.DC.

As folhas (2,805 kg) foram secas em estufa de ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 72 horas. Após secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obteve-se 800 g de pó seco.

4.3. Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas e caules de *Cordia rufescens* A.DC.

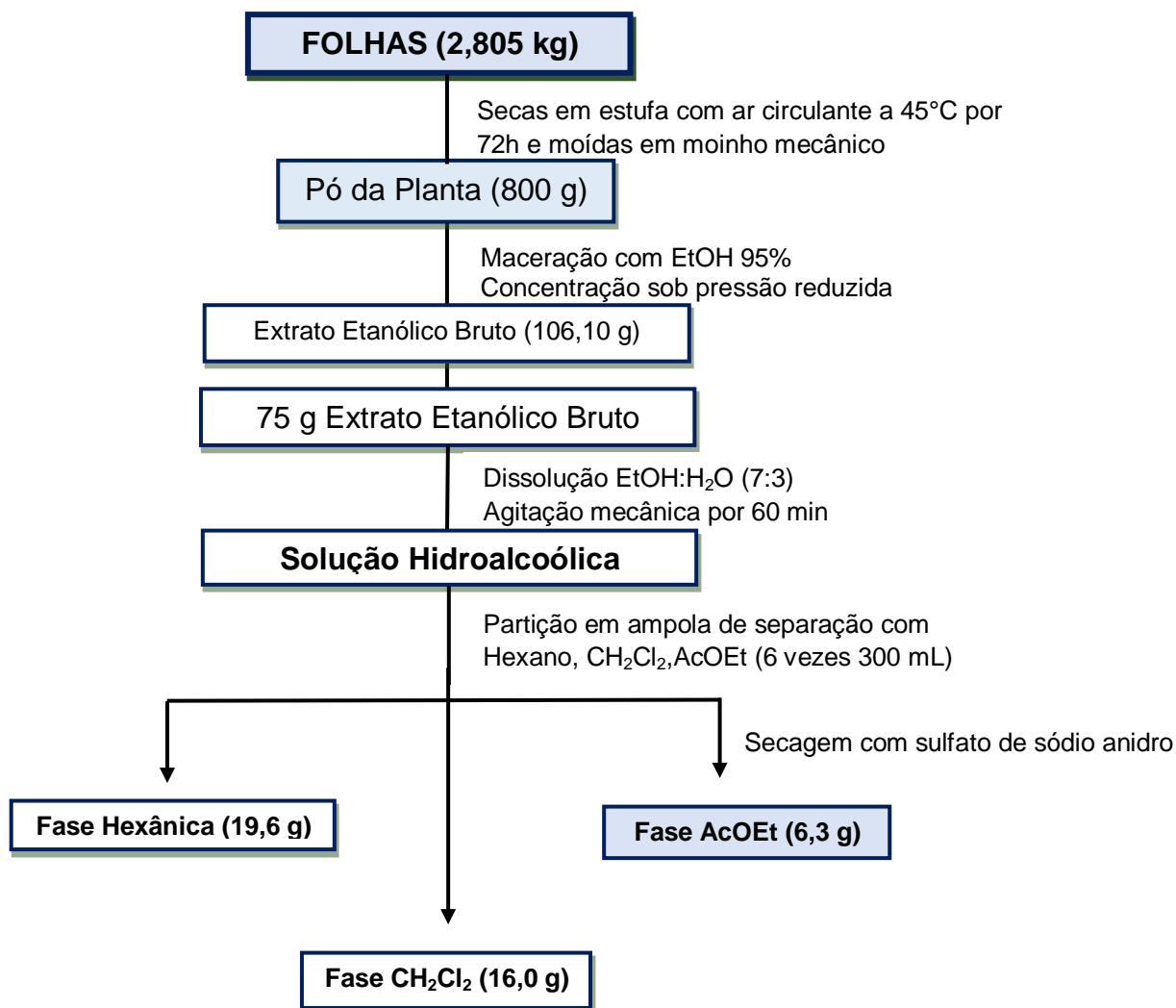
O material vegetal seco e pulverizado (800 g) foi submetido a maceração com etanol (EtOH) a 95%, em um recipiente de aço inoxidável denominado percolador. Foram feitos três processos de extração durante 72 horas, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador a uma temperatura média de 45 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obtendo-se 106,10 g do extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1, página 29).

4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) do material vegetal de *Cordia rufescens* A.DC.

Para obtenção das fases, foram utilizadas 75 g do extrato etanólico bruto. Este foi dissolvido numa mistura etanol:água (7:3) e homogeneizado em agitação mecânica por 60 minutos, obtendo-se uma solução aquosa. Essa solução foi submetida a partição líquido-líquido em ampola de separação, obtendo as respectivas fases (Esquema 1, página 29).

As fases hexânica, diclorometado e acetato de etila foram tratadas com sulfato de sódio anidro para secagem, submetidas a pressão reduzida, concentradas em evaporador rotatório à temperatura de 45 °C, obtendo-se três fases: 19,6 g da fase hexânica, 16g da fase CH_2Cl_2 e 6,3 g da fase AcOEt .

Esquema 1 - Etapas envolvidas no processo de obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de *Cordia rufescens* A.DC.

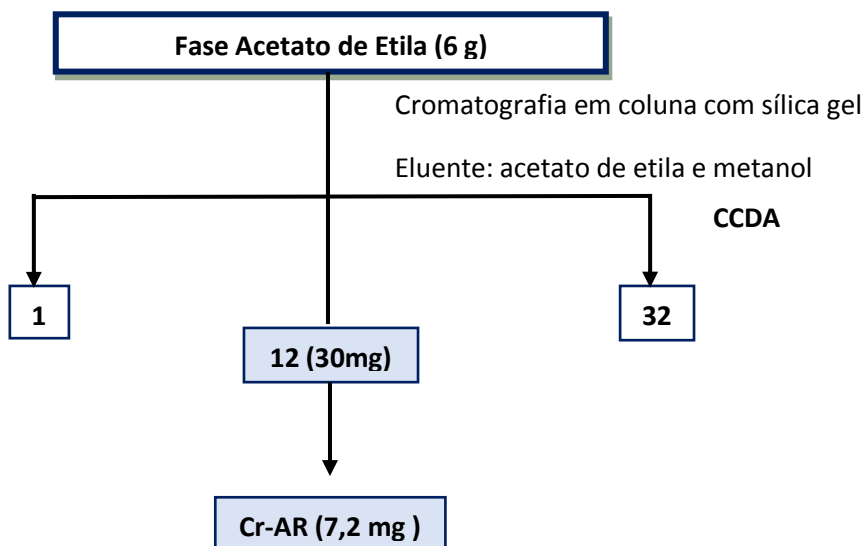


4.5. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de *Cordia rufescens* A.DC.

Uma alíquota da fase acetato de etila (6 g) foi submetida a cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel, e como fase móvel acetato de etila e metanol. Desta forma foram obtidas 32 frações que foram submetidas a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus fatores de retenção (RFs), após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara saturada com vapores de iodo. A fração 12

apresentou-se como uma mancha única, e foi submetida à análise de RMN de ^1H e ^{13}C sendo codificada como Cr-AR (Esquema 2, página 31)

Esquema 2 - Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *Cordia rufescens* A.D C.



4.6. Caracterização estrutural do composto isolado

A identificação estrutural da substância isolada de *Cordia rufescens* (Cr-AR) foi realizada por meio de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio e Carbono 13, unidimensionais (RMN ^1H e RMN ^{13}C - APT).

Foram utilizados espectrômetros BRUCKER 400 e 100 MHz do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da UFPB. Onde as amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD_3OD), e utilizado como referência interna o seu próprio solvente.

4.8. Caracterização do perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato etanólico bruto de *Cordia rufescens*

4.8.1 Materiais

A caracterização do perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB) foi realizada utilizando a substância ácido rosmarínico como padrão analítico, obtido da Sigma Aldrich, com teor de pureza > 98% e a partir da co-injeção do EEB com

padrão de ácido rosmarínico. Os solventes utilizados foram metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil), ácido fosfórico e água ultrapura obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore®). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

4.8.2 Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, auto injetor SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A5, detector SPD-M20A diode array. A coluna utilizada foi Kromasil® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

4.8.3 Desenvolvimento

Para análise cromatográfica do EEB e do padrão foi desenvolvida uma metodologia na qual a fase móvel utilizada foi metanol (MeOH) com água (H₂O) ultrapura a 0,1% de ácido fosfórico numa proporção inicial de (38:48 v/v) MeOH / H₂O. A corrida teve um tempo total de 60 minutos. A eluição foi realizada em modo gradiente, de 38 a 42% em 5 min, 42 a 45% em 9 min, 45 a 50% em 12 min, 50 a 45% em 15 min, 45 a 40% em 17 min, 40 a 38% em 20 min, 38 a 38% em 23 min, permanecendo isocrático até 60 min (Figura 6, página 33). O volume de injeção foi de 20 µL, com fluxo de fase móvel constante de 1,0 mL / min e a detecção foi feita utilizando um detector de arranjo fotodiodo (DAD) em comprimento de onda de 330 nm.

Figura 6 – Modo de eluição

42 a 42% em 5 min
42 a 45 % em 9 min
45 a 50% em 12 min
50 a 45% em 15 min
45 a 40% em 17 min
40 a 38% em 20 min
38 a 38% em 23 min

O EEB (5mg) foi diluído numa solução constituída por água-MeOH (1:1 v/v) até uma concentração final de 5 mg/mL. Os padrões foram diluídos na mesma solução acima descrita até que chegassem a uma concentração final de 1mg / mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo fitoquímico das folhas de *Cordia rufescens* A. DC

5.1.1 Determinação estrutural de Cr-AR

Ao analisar a fração 12 do EEB de *Cordia rufescens*, observou-se absorções múltiplas, levando a propor que esta fração poderia tratar-se de uma mistura de compostos fenólicos. A sugestão de que essa fração tratar-se-ia de uma mistura foi corroborada pelo espectro de RMN ^1H (Figura 7, página 35).

Para confirmar a proposta, a fração 12 (1 mg) foi submetida a análise por CLAE em escala analítica (Figura 8, página 35), que ao ser analisada foi possível confirmar a sugestão de que se tratava de uma mistura. Utilizando o mesmo método foi realizada a CLAE em escala preparativa (Figura 9, página 36) para a coleta de cada amostra. O método utilizado foi o isocrático MeOH: H_2O a 0,1% de ácido fórmico, na proporção inicial de 40:60 com fluxo de 8 mL min^{-1} por 80 min. A amostra foi dissolvida em 1 mL de MeOH, sendo injetado um volume de 100 μL em cada

análise. O cromatograma apresentou três picos (Figura 8, página 35), que foram coletados manualmente, fornecendo as substâncias Cr-1, Cr-2 e Cr-AR (tR = 14,976 min).

A substância Cr-AR apresentou-se como um sólido amorfo e foi submetida a análises de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN ^1H e suas expansões (Figuras 11 a 13, página 38 e 39) foi possível observar dois dupletos em δ_{H} 7,53 e 6,25 com constante de acoplamento (J) de 16,0 Hz, que foram atribuídos ao par de prótons da ligação trans entre os carbonos 7 e 8. Os sinais entre δ_{H} 6,59 e 7,03, com integração para um total de 6 hidrogênios, foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos 2, 5, 6, 2', 5' e 6'. Em δ_{H} 5,16 observou um duplo duplete que foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 8'. Os sinais em δ_{H} 3,03 (2 quartetos) atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono 7'.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 15, página 40) foi possível observar a presença de um sinal em δ_{C} 177,2 atribuído ao carbono 9' da carboxila e um sinal em δ_{C} 168,5 atribuído ao carbono 9 do grupamento éster. Os sinais em δ_{C} 149,6, 146,7, 146,1 e 145,2 correspondem, respectivamente, aos carbonos aromáticos 4, 3, 3' e 4' ligados às hidroxilas fenólicas. Os carbonos 1 e 1' estão representados pelos sinais em δ_{C} 127,6 e 129,5. Os sinais em δ_{C} 123,1, 121,7, 117,5, 115,1, 116,2 e 114,5 foram atribuídos aos carbonos aromáticos não-substituídos 6, 6', 2', 5, 5' e 2, respectivamente. Os carbonos 7 e 8 da dupla ligação apresentam sinais em δ_{C} 147,5 e 116,4. Em δ_{C} 73,3 aparece o sinal do carbono 8' e em δ_{C} 38,0 o sinal do carbono 7'. Através da análise dos espectros foi possível identificar a substância isolada como o ácido rosmarínico (Figura 10, página 37), em conformidade com os dados encontrados em literatura (Tabela 1, página 36) (KELLEY et al., 1976; KELLEY et al., 1975).

Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H da fração 12 da fase acetato de etila de *Cordia rufescens* (δ , CD_3OD , 400 MHz)

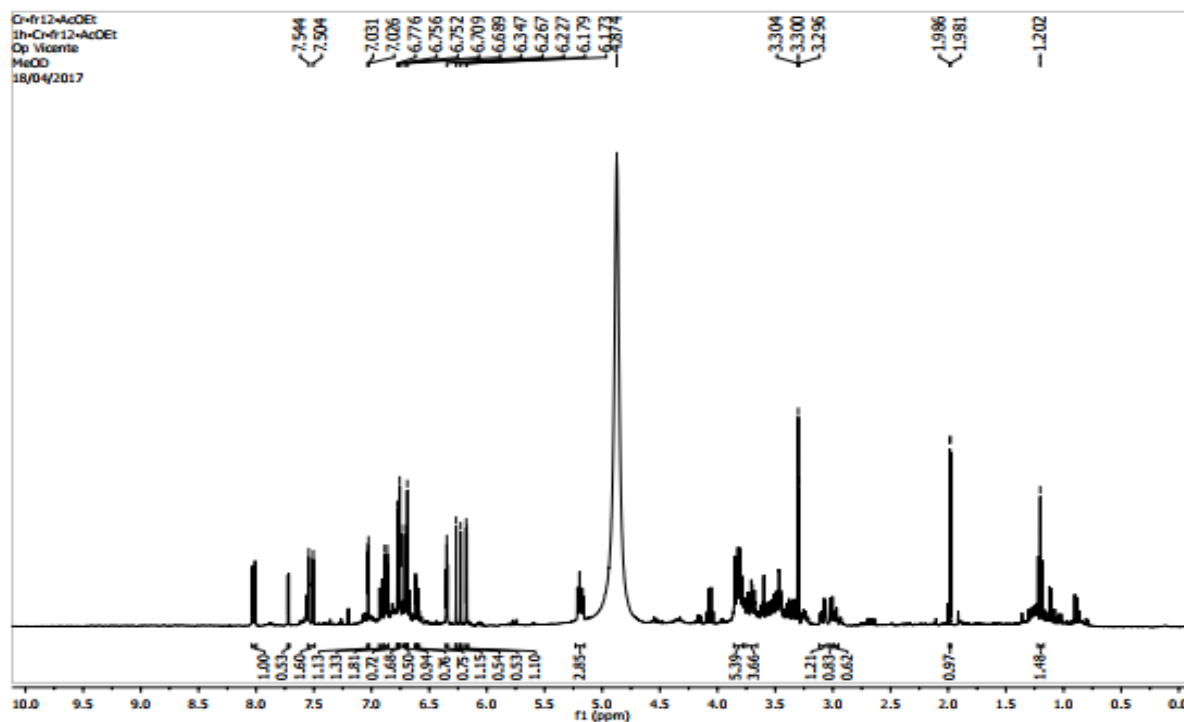


Figura 8 – Cromatograma da fração 12 da fase acetato de etila de *Cordia rufescens* A.DC. por CLAE em escala analítica

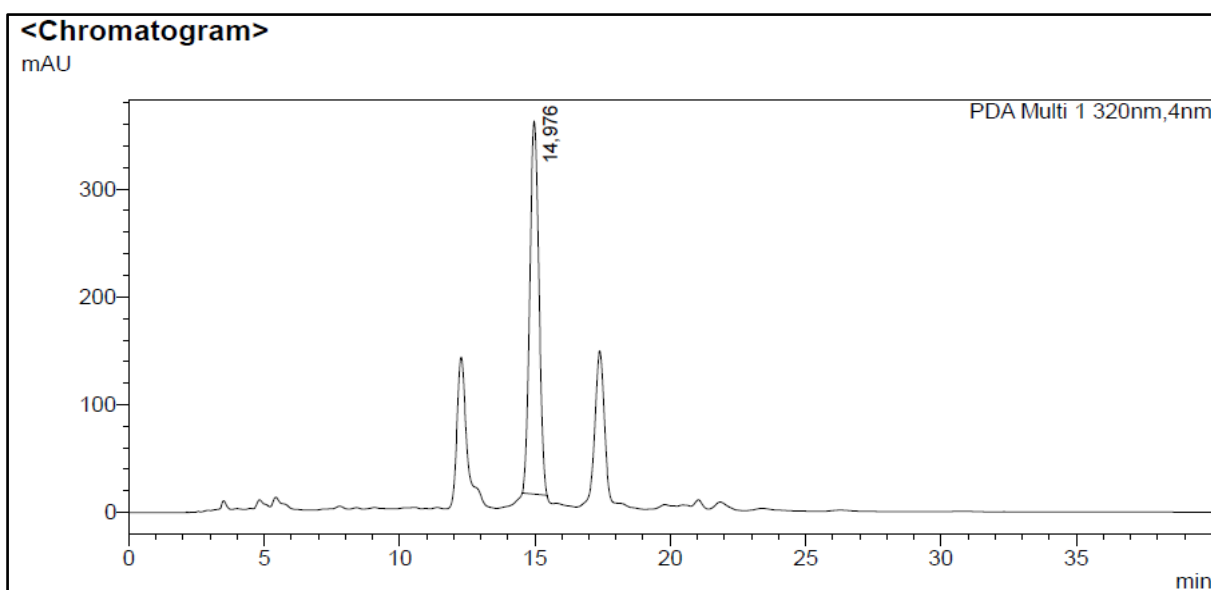


Figura 9 – Cromatograma da fração 12 da fase acetato de etila de *Cordia rufescens* A.DC. por CLAE em escala preparativa

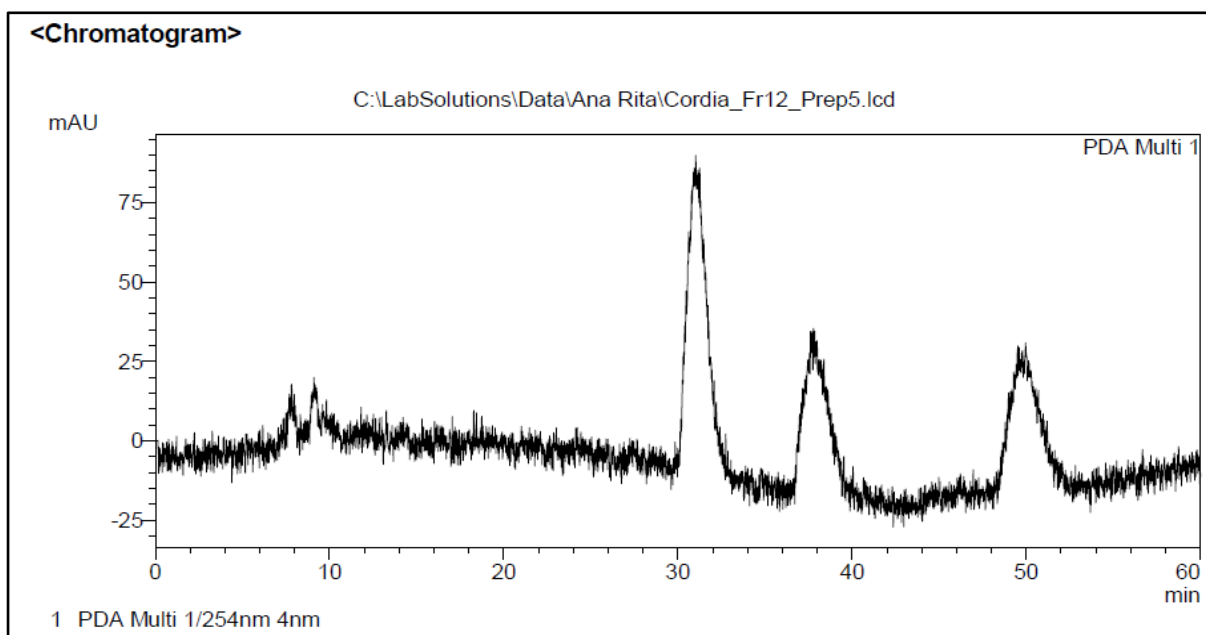


TABELA 1- Deslocamentos químicos de ^1H E ^{13}C do ácido rosmarínico (CD_3OD , 400 e 100 MHz respectivamente)

Cr- AR			KELLEY et al. (1976)	
C	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$
1	127,6	-	126,5	-
1'	129,5	-	129,9	-
2	114,5	7,03 (d, $J = 2,0$ Hz)	113,6	7,09 (d, $J = 2,0$ Hz)
2'	117,5	6,74 (d, $J = 2,0$ Hz)	117,1	6,79 (d, $J = 2,0$ Hz)
3	146,7	-	143,7	-
3'	146,1	-	143,7	-
4	149,3	-	146,7	-
4'	145,2	-	142,4	-
5	115,1	6,79 (d, $J = 8,0$ Hz)	115,9	6,79 (d, $J = 8,0$ Hz)
5'	116,2	6,68 (d, $J = 8,0$ Hz)	115,9	6,69 (d, $J = 8,0$ Hz)
6	123,1	6,94 (dd, $J = 2,0$ Hz)	122,4	6,96 (dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz)
6'	121,7	6,60 (dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz)	121,8	6,60 (dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz)
7	147,5	7,53 (d, $J = 16,0$ Hz)	145,8	7,50 (d, $J = 16,0$ Hz)
7' (2H)	38,0	3,03 (2 q, $J = 5; 8; 14$ Hz)	36,8	3,03 (2 q, $J = 5; 8; 14$ Hz)
8	116,4	6,25 (d, $J = 16,0$ Hz)	115,0	6,23 (d, $J = 16,0$ Hz)
8'	76,2	5,16 (dd, $J = 5; 8$ Hz)	76,2	5,17 (dd, $J = 5; 8$ Hz)
9	168,5	-	168,6	-
9'	177,2	-	177,2	-

Figura 10 – Estrutura do ácido rosmarínico

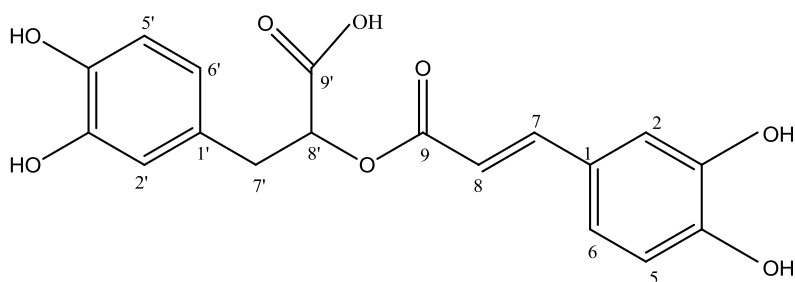


Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H Cr-AR (δ , CD_3OD , 400 MHz)

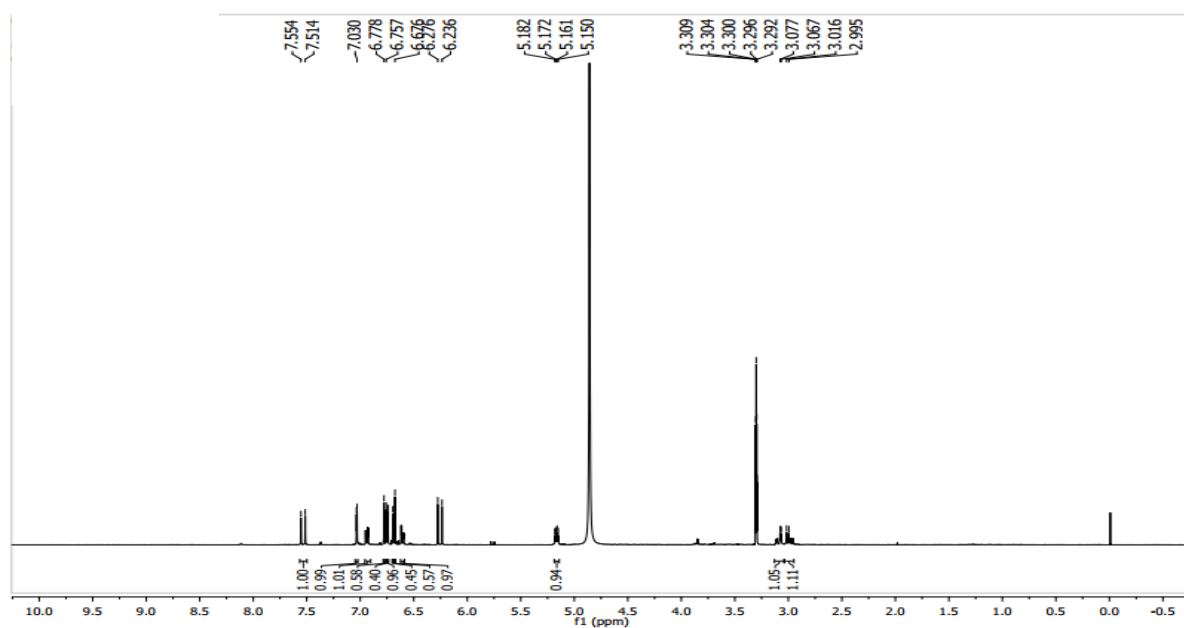


Figura 12 – Expansão do espectro de RMN de ^1H Cr-AR (δ , CD_3OD , 400 MHz)

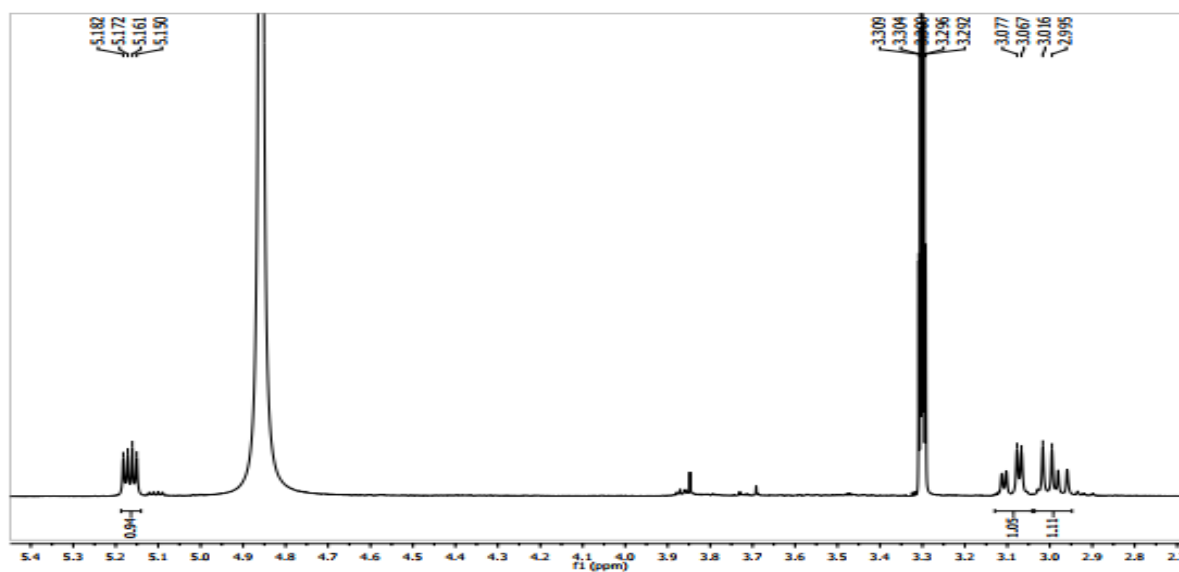


Figura 13 – Expansão do espectro de RMN de ^1H Cr-AR (δ , CD_3OD , 400 MHz)

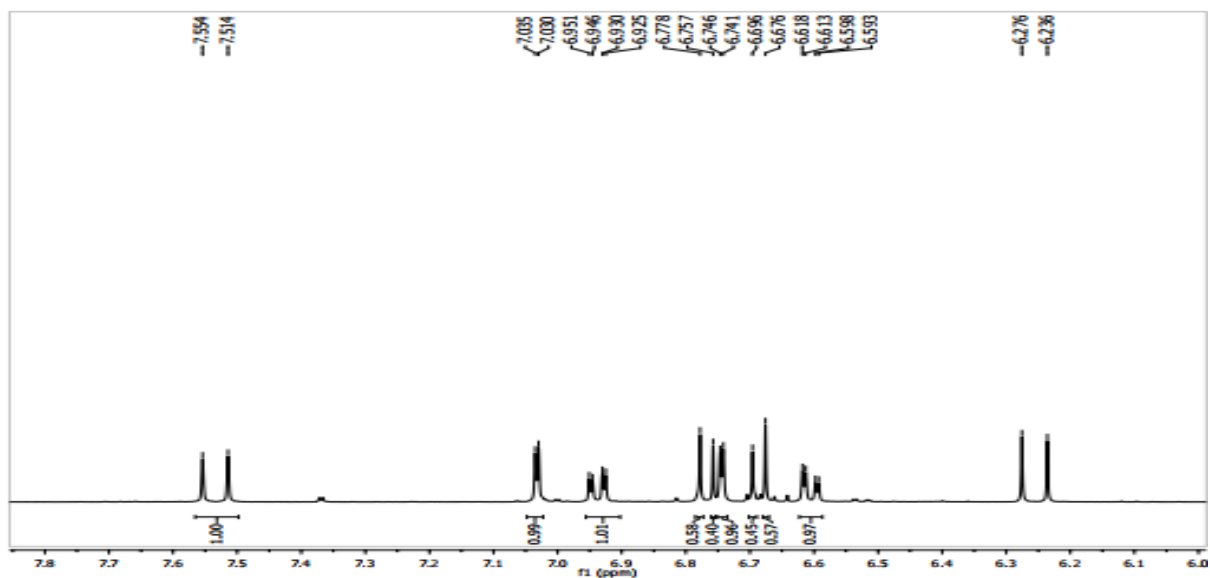


Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C – APT Cr-AR (δ , CD_3OD , 100 MHz)

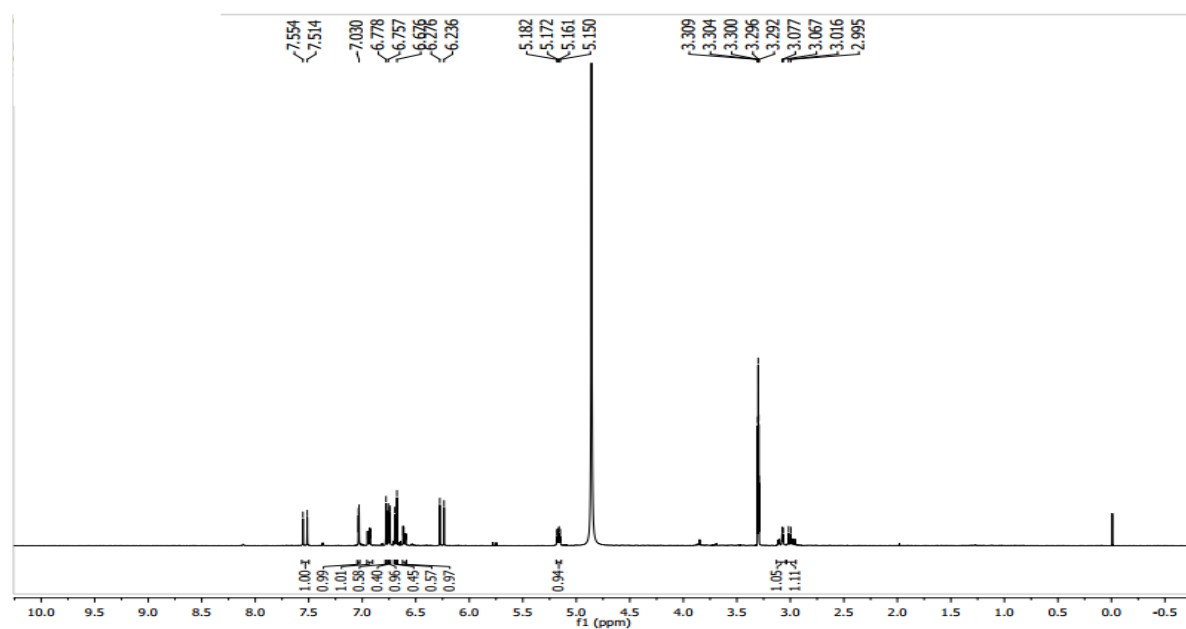
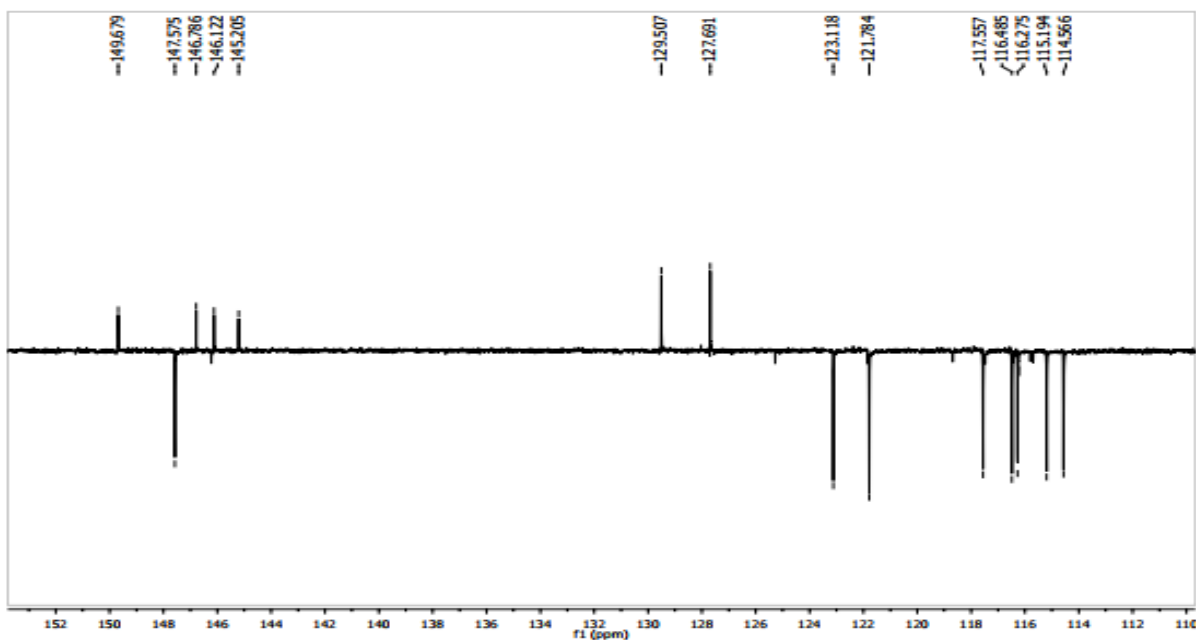


Figura 15 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT Cr-AR (δ , CD_3OD , 100 MHz)



5.2. Determinação do Ácido Rosmarínico no Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Cordia rufescens* A. DC

A partir da análise cromatográfica em CLAE, foi possível observar o perfil cromatográfico do EEB de *Cordia rufescens*, e do padrão de ácido rosmarínico.

Observou-se no cromatograma do EEB (Figura 16, página 41) o pico com tempo de retenção em 17min 09s foi denominado de Pico 1 e revelou pureza de pico 1,000 (Figura 17, página 42).

Figura 16 – Perfil cromatográfico do EEB e espectro de absorvância

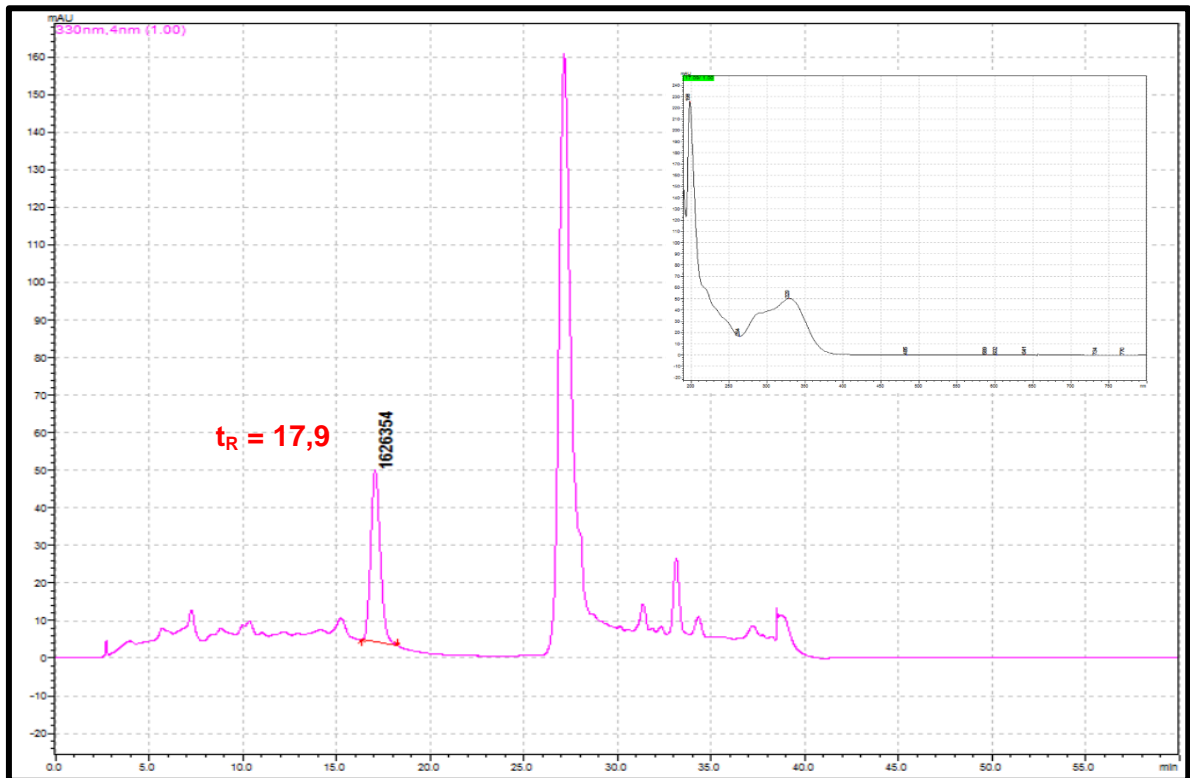
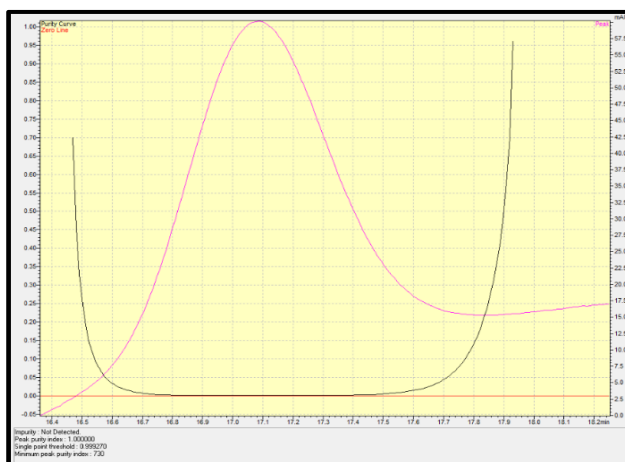


Figura 17 – Curva de pureza do EEB



Em seguida, foi injetado o padrão de ácido rosmarínico, obtendo-se o cromatograma (Figura 18, página 42) com um pico com tempo de retenção em 15min 79s revelando pureza de pico de 1,000 (Figura 17, página 41).

Figura 18 – Perfil cromatográfico do padrão de ácido rosmarínico e espectro de absorvância

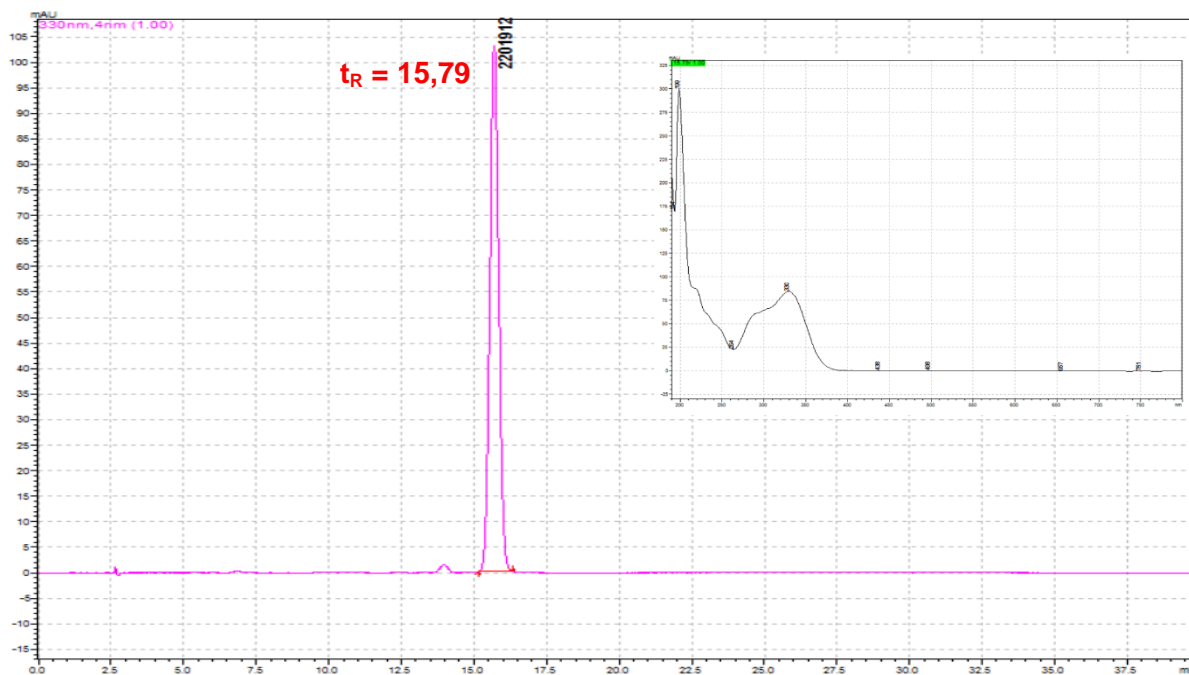
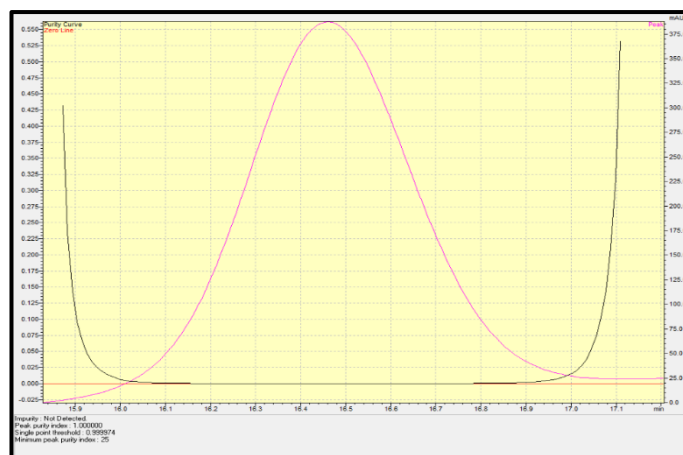


Figura 19 – Curva de pureza do padrão ácido rosmarínico



Em seguida foi feita uma co-injeção do extrato (Figura 20, página 45) com padrão de ácido rosmarínico, a fim de comprovar se o pico se tratava ou não da substância proposta. O cromatograma resultou numa perfeita sobreposição de sinais, no mesmo tempo de retenção em 17min 97s, revelou pureza de pico de 0,999 (Figura 21, página 45), com uma elevação de seu pico, e conseqüentemente, de um aumento da intensidade do pico referente a co-injeção. Confirmando assim, que o pico se tratava do ácido rosmarínico.

Figura 20 – Cromatograma da co-injeção do EEB com o padrão ácido rosmarínico

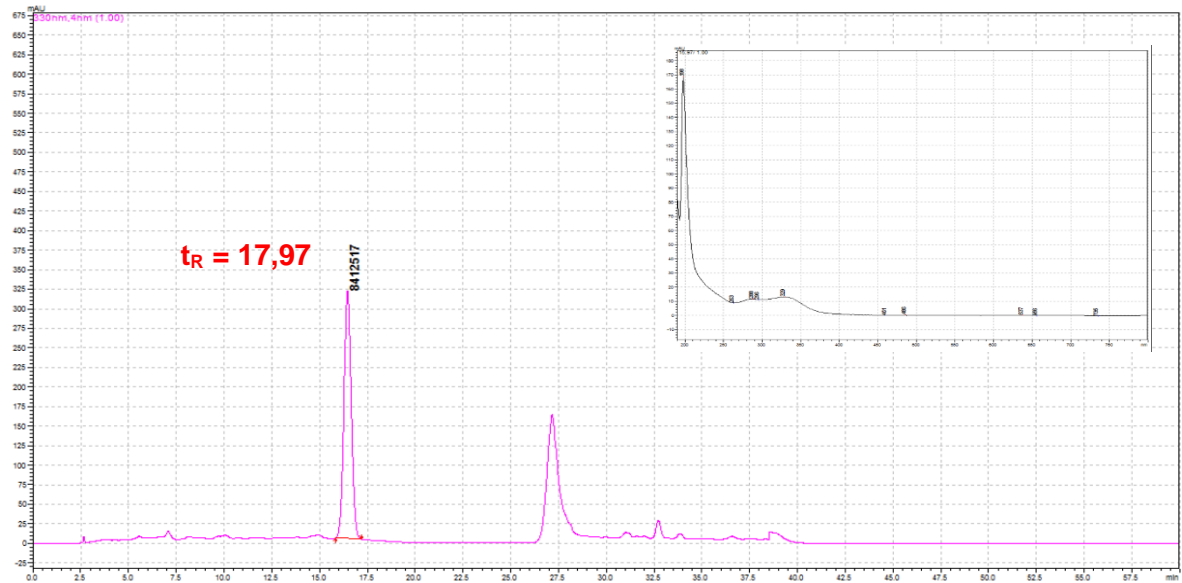


Figura 21 – Curva de pureza da co-injeção do EEB com o padrão ácido rosmarínico

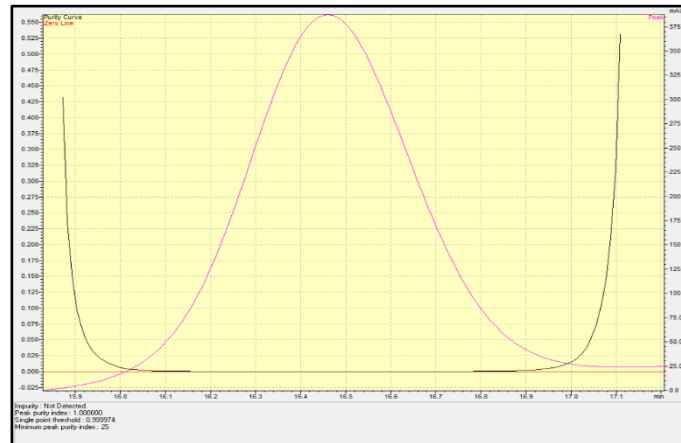
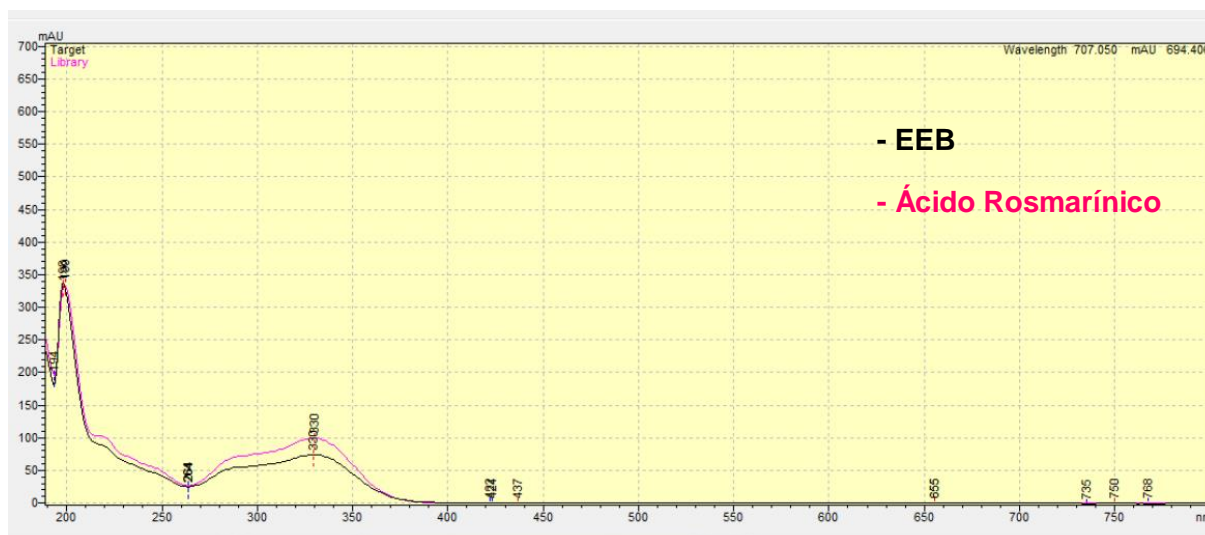


Figura 22 – Sobreposição espectro de ultravioleta do EEB com o padrão ácido rosmarínico



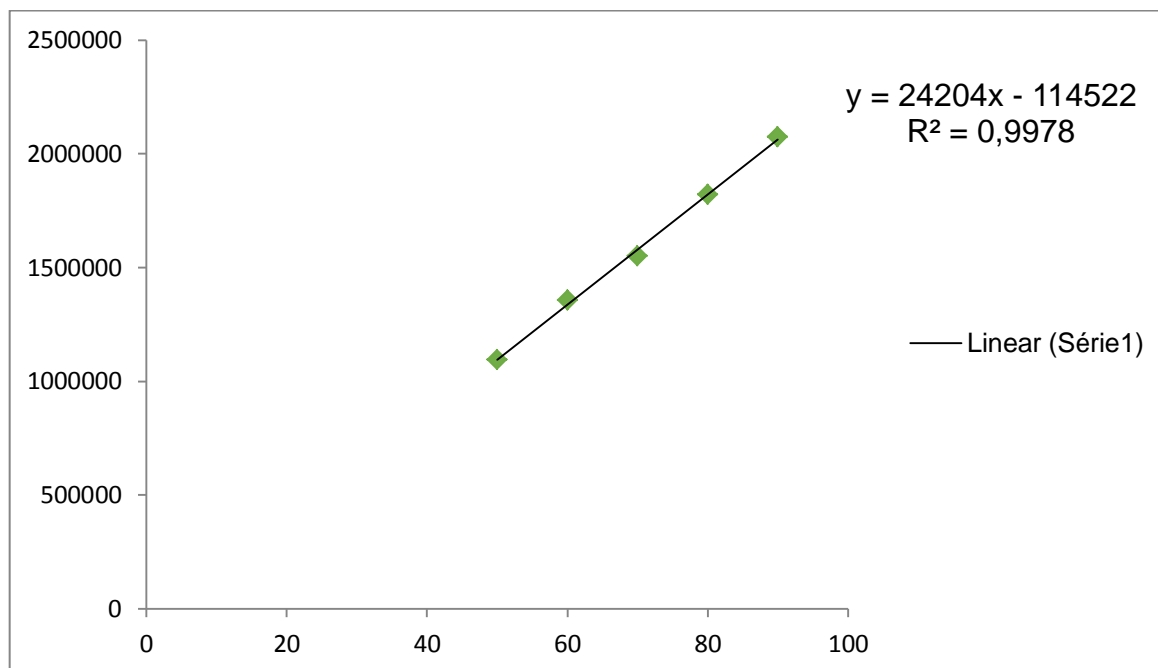
Todas as injeções foram feitas em triplicatas, e a partir dos dados obtidos nesses cromatogramas, foram feitas as médias das áreas do pico referente ao ácido rosmarínico, bem como para o EEB, como descrito na Tabela 2 (página 45).

TABELA 2: Concentrações utilizadas e média das áreas obtidas nos cromatogramas dos padrões de ácido rosmarínico e no EEB

Concentrações	Áreas (média) \pm D.P.	CV%
50 $\mu\text{g/mL}$	1096263 \pm 53228,44	4,855445
60 $\mu\text{g/mL}$	1356434 \pm 68854,7	5,076155
70 $\mu\text{g/mL}$	1550311 \pm 67061,64	4,326334
80 $\mu\text{g/mL}$	1822320 \pm 86365,85	4,739335
90 $\mu\text{g/mL}$	2073530 \pm 68980,58	3,326722
5 mg/mL (EEB)	1626354 \pm 45109,25	2,591175

A curva de calibração do padrão ácido rosmarínico forneceu uma equação da reta: $y = 24204x - 114522$, e um $R^2 = 0,9978$ (Figura 23, página 47). A partir destes dados foi possível quantificar o AR existente no extrato testado.

Figura 23 – Curva de titulação utilizada para quantificação do ácido rosmarínico



Após a análise dos dados obtidos é possível então observar que para cada 5 mg de EEB a quantidade de ácido rosmarínico é $71,9252 \pm 1,8637 \mu\text{g}$.

Foi possível determinar a concentração de ácido rosmarínico através dos estudos, sendo necessário a validação do método para a quantificação

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos o estudo fitoquímico dos constituintes da fase acetato de etila de *Cordia rufescens* A.DC., levou ao isolamento de uma substância. Com a análise dos espectros e em comparação com os dados da literatura, foi possível identificar Cr-AR como sendo ácido rosmarínico. A identificação do ácido rosmarínico permitiu o conhecimento da existência deste na espécie, e assim o desenvolvimento de uma metodologia analítica que possibilitou sua quantificação no EEB. Desta forma foi possível determinar a existência do metabólito secundário ácido rosmarínico na espécie de *Cordia rufescens* A.DC., como também dá um passo no processo de padronização pela quantificação do ácido rosmarínico, um metabólido que tem suas propriedades farmacológicas já estabelecidas. Sendo esses estudos relatados pela primeira vez na espécie em estudo, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico desta espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ALKAM, T., NITTA, A., MIZOGUCHI, H., ITOH, A., NABESHIMA, T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A beta(25-35). **Behavioural Brain Research**, v.180, n.2, p.139-145. 2007.
- BARA, M. T. F., RIBEIRO, P. A. M., ARANTES, M. D. C. B., AMORIM, L. L. S. S., PAULA, J. R. D. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p.211-215. 2006.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, v. 13, p. 85-102, 1997
- BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil. São Paulo, **EDUSP**, 56-58, 1986
- BARROSO, I. C. E.; OLIVEIRA, F.; BRANCO, L. H. Z. O gênero *Cordia* L.: botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta**, Paulista, v. 20, n. 1, 15-34, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. 118 Disponível em: Acesso em: 10 nov. 2017
- BRASIL. Portaria Interministerial nº 2.960. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 dez. Seção 1, nº 240, p. 56. 2008
- BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo , v. 33, n. 1, p. 229-239. 2010
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fontes de medicamentos. **Ciências e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39. 2003
- CHAUHAN, R. S.; KAUL, M. K.; SHAHI, A. K.; KUMAR, A.; RAM, G.; TAWA, A. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 654-656, 2009

CHU, X. et al. Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid. **Molecules**, v.17, 3586-3598. 2012

COLLINS, C. H.; BRAGA, G; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**: Editora unicamp. 2006

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer. **Revista Virtual de Química**, v. 2 (1), p. 47-58, 2010

DE MENEZES, J. E. S. A.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; MONTENEGRO, R. C.; WILKE, D. V.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. A cytotoxic meroterpenoid benzoquinone from roots of *Cordia globosa*. **Planta Medica**, v. 71, p. 54-58. 2005

DOMITROVIC, R. et al. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice, **Food and Chemical Toxicology**, v.51, 370-378. 2013

DUTRA R.C. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacology research**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>, 2016

FARAGA, M. A.; PORZELA, A.; WESSJOHANNA, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D-NMR techniques. **Phytochemistry**, v. 76, p. 60-72. 2012

FREITAS, M.R.; ALENCAR, J. L. de; DA-CUNHA, E. V. L., BARBOSAFILHO, J. M. Milonine, na 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1553-1555. 2010

HAMAGUCHI, T.; ONO K.; YAMADA M. Phenolic Compounds prevent Alzheimer's Pathology though diferente effects on the amiloid aggregation parthway. **The American Journal of Phatology**, 175, 2557-2565. 2009

HUR, Y.G.; SUH C. H.; KIM S.; WON J. Rosmarinic acid inducis apoptosis of activated T cells. **Journal of Clinical Immunology**, 27, 36-45. 2006

- KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74 (3), p. 496-511, 2011
- KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Insectidal propperties of Mentha species: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 802-817. 2014
- MELO, J. I. DE M.; LYRA-LEMOS, R. P. Sinopse taxonômica de Boraginaceae sensu lato A, Juss no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22(3), p. 701-710, 2008
- MELO, J. I. M.; ANDRADE, W. M. Boraginaceae s.l. A. Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 369- 378. 2007
- MOON, D.O. et al. Rosmarinic acid sensitizies cell death though of TNF-a-induced na ROS generation. **Cancer Letters**, 288, 183-191. 2010
- MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of Rosemary extracts linked of their polyphenol composition. **Free Radical Research**, 40, 223-231. 2006
- NASCIMENTO, R. Dissertação de Mestrado: Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarímico em modelos animais. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB. 2016
- NEWMAN DJ, CRAGG CM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. 70(3): 461-477. 2013
- ONO, K. et al. Phenolic compounds Prevent amyloidbprotein oligomerization by site-specific binding. **The Journal of Biological Chemistry**, 287, 631-643. 2012
- PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 37-40. 2004
- PETERSEN, M.; Simmonds, M.S.J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121–125, 2009

- SAITO, M. L.; DE OLIVEIRA, F. Physical and chemical characteristics of a fluid extract of *Cordia ecalyculata* Vell – Boraginaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 3-11, 1986
- SANTOS, R. P.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, F. A.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Characterization of two minor saponins from *Cordia piauiensis* by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 43, p. 494 – 496. 2005
- SANTOS, R. P.; VIANA, F. A.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Structure elucidation and total assignment of ¹H and ¹³C NMR data for a new bisdesmoside saponin from *Cordia piauiensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 41, p. 735 – 738. 2003
- SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491. 2003a
- SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2004b
- SILVA, S. A. S.; SOUTO, A. L.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R. A new aryl-naphthalene type lignan from *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae). **ARKIVOC**. v. vi, p. 54 – 58. 2004a
- SPOON, T. R.; KESSELI, R. V. Development of microsatellite markers in *Cordia bifurcata* (Boraginaceae) and cross-species amplification in *Cordia inermis* and *Cordia pringlei* **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 989–992. 2008
- TEPEA, B. Antioxidant Potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extract of *Salvia verticillate*, **Food chemistry**, 100, 985-994. 2007
- VALE, A. Dissertação de mestrado: Estudo fitoquímico e atividades farmacológicas de *Cordia rufescens* e *Cordia superba* (boraginaceae). UFPB, João Pessoa-PB. 2017
- VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28 (3), p. 519-528. 2005